

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370028

研究課題名（和文） 昆虫の学習における認知的過程の神経基盤

研究課題名（英文） Neural basis of cognitive processes underlying insect learning

研究代表者

水波 誠（MIZUNAMI MAKOTO）

北海道大学 大学院理学研究院・教授

研究者番号：30174030

研究成果の概要（和文）：研究代表者は、昆虫が学習した行動を遂行するためには学習した内容の想起が必要であるとの仮説を提案している。本仮説の重要な予測の1つは、繰り返して訓練を行うと学習内容の想起なしに学習行動が遂行されるようになることである。コオロギを材料とした研究により、この予測の正しさを確認する成果が得られた。さらにゴキブリを材料とした研究により、脳の連合中枢の1つであるキノコ体の垂直葉に投射するオクトパミンニューロンがこの記憶想起に関わることが判り、この仮説の神経基盤の一端が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We have proposed a model in which conditioned responses of insects requires activation of neurons that represent unconditioned stimulus. We performed experiments to evaluate predictions from this model and to examine neural substrates underlying this model. We found that crickets that received excessive training exhibit conditioned responses even after blockade of synaptic transmission from neurons that represent US, indicating “habit formation” in insects. We also found that the octopaminergic neurons projecting to the vertical lobe of the mushroom body participate in memory retrieval in cockroaches.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
22年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
23年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：神経行動、学習、記憶、微小脳、昆虫

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、昆虫の学習についての種々の研究結果を総合し、コオロギなどの昆虫が学習した行動を遂行するためには、学習した内容の想起が必要であるとのモデル、すなわち Mizunami-Unoki モデルを提案している。このモデルは、昆虫の学習行動が一種の「条

件反射」であるとの従来の説に反し、哺乳類の学習において想定されている「認知的」な過程が昆虫の学習にも関わることを示唆するものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Mizunami-Unoki モデルの

実験的な検証し、その神経基盤の解明することである。

(1) Mizunami-Unoki モデルのからの重要な予測として、過剰な古典的条件付け訓練を繰り返すと学習内容の想起なしに学習行動が起こるようになること、すなわち習慣形成が起こることがある。しかしそのような現象はこれまで昆虫はおるか哺乳類においても知られていない。本研究の目的の1つは、昆虫の古典的条件付けにおいて本当に習慣形成が成立するかを明らかにすることである。また習慣形成が成立した場合、消去訓練を行うことで習慣を消去できるかを明らかにする。

(2) 嗅覚記憶の読み出しに関わる脳領域の同定。研究代表者は、ワモンゴキブリにおいて、嗅覚学習にケニオン細胞に関わる可能性を示唆する証拠を得ている。またゴキブリにオクトパミン受容体の阻害剤を投与すると匂いと報酬(砂糖水)の連合学習が阻害されることから、オクトパミン作動性ニューロンが砂糖水の報酬情報を伝える事を示唆する結果を得ている。本研究のもう1つの目的は、これらの予備的知見に基づく実験により、ゴキブリの脳におい嗅覚記憶の読み出しに関わる脳領域を同定することである。

3. 研究の方法

(1) 材料：研究にはフタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) およびワモンゴキブリ (*Periplaneta americana*) を用いた。

(2) 薬理：オクトパミン受容体阻害剤 (エピナスチンなど) およびドーパミン受容体阻害剤 (フルペンチキソルなど) を血中投与または脳の特定領域に局所投与し、記憶の読み出しに与える影響について調べた。

(3) 学習実験：コオロギの学習訓練では、匂いまたは視覚的なパターン (模様)、の条件刺激 (conditioning stimulus, CS) を与えた直後に水 (報酬) または塩水 (罰) の無条件刺激 (unconditioned stimulus, US) を与えた。コオロギは、実験の前に3日間絶水させ、水への欲求を高めさせた。嗜好性テストを訓練前と訓練後に行い、その結果を比較し学習訓練の効果を評価した。ゴキブリの学習訓練では、ゴキブリを台に固定し、唾腺神経を露出させ唾腺ニューロンの神経活動を慢性記録した。ゴキブリの触角に匂い (CS) を与えた直後に砂糖水 (US) を呈示し、対呈示の前後での匂い応答の変化について統計的に解析した。

4. 研究成果

(1) フタホシコオロギに1セッション2回の学習訓練を8時間以上の間隔をあけて3セッション繰り返すと、記憶テスト前にオクトパミン阻害剤を投与しても、記憶の読み出しが妨げられないことが分かった。すなわ

ち訓練により長期記憶が生成されたのち、さらに同じ訓練が少なくとも2回繰り返されると、学習内容の想起なしに学習行動が遂行されるようになる、すなわち習慣形成が起こる。従来の哺乳類での研究から、連合学習における習慣形成はオペラント条件付けにのみでおこると考えられていた。本研究により、習慣形成が古典的条件付けにおいても習慣形成が起こることが始めて明らかになった。

(2) 習慣形成の成立後に、十分な回数の消去訓練を行ったコオロギでは、オクトパミン阻害剤を投与すると記憶読み出しが阻害されることが判った。これは、消去訓練後には、記憶読み出しに報酬情報をコードするオクトパミンニューロンの活性化が必要なこと、すなわち、記憶の読み出しに学習内容の想起が必要となる事を示している。この結果から、過剰訓練により習慣形成が起こっても、習慣形成前と同様に報酬刺激によって報酬情報をコードするオクトパミンニューロンは活性化されるが、その活性化が学習行動の遂行には必要ではなくなることで、また消去訓練を行うとその必要性が回復し、習慣形成前の状態に可逆的に戻ることが示唆された。この成果は、Mizunami-Unoki モデルの妥当性とその神経基盤を明らかにしたのみならず、昆虫の古典的条件付けにおける習慣形成が哺乳類 (ラットやマウス) で報告されている習慣形成とは異なるユニークな性質をもつ現象であることを示す画期的なものである。

(3) ゴキブリの嗅覚記憶の読み出しに脳のどの領域に関わるのかを、薬物の局所投与により検討した。オクトパミン受容体の阻害剤をキノコ体の垂直葉 (出力部位) に局所投与すると、記憶の読み出しが阻害された。キノコ体の傘 (入力部位) や触角葉 (一次嗅覚中枢) への局所投与は効果がなかった。このことから、キノコ体の垂直葉に投射するオクトパミン作動性ニューロンが記憶の読み出しに関わることを示唆された。

(4) 免疫組織化学によりゴキブリのキノコ体垂直葉に投射するオクトパミン免疫陽性ニューロンの形態を調べた結果、それらのニューロンは垂直葉の γ 層で終末する事が分かった。この層は発生の初期に出現する γ ケニオン細胞が終末する領域であり、匂い記憶の読み出しに γ ケニオン細胞が主要な役割を果たす事が明らかになった。これらは Mizunami-Unoki モデルの神経基盤を更に明らかにする上で核心となる成果である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計14件)

(1) Nishino H., Iwasaki M., and Mizunami

M. (2011) Pheromone detection by a pheromone emitter: a small, sex pheromone-specific processing system in the female American cockroach. *Chem. Senses*. 36:261-270. DOI:10.1093/chemse/bjq122 査読有

(2) Watanabe H., Matsumoto S. C., Nishino H. and Mizunami M. (2011) Critical roles of mecamylamine-sensitive mushroom body neurons in insect olfactory learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 95:1-13. DOI: 10.1016/j.nlm.2010.10.004 査読有

(3) Watanabe H., Nishino H., Nishikawa M., Mizunami M. and Yokohari F. (2010) Complete mapping of glomeruli based on sensory nerve branching pattern in the primary olfactory center of the cockroach *Periplaneta americana*. *J. Comp. Neurol.* 518: 3907-3930. DOI:10.1002/cne.22452 査読有

(4) Yamagata N. and Mizunami M. (2010) Spatial representation of alarm pheromone information in a secondary olfactory center in the ant brain. *Proc. R. Soc. B.* 277: 2465-2475. DOI: 10.1098/rspb.2010.0366 査読有

(5) Nishino H., Yoritsune A., and Mizunami M. (2010) Postembryonic development of sexually dimorphic glomeruli and related interneurons in the cockroach *Periplaneta americana*. *Neurosci. Lett.* 469: 60-64. DOI: 10.1016/j.neulet.2009.11.044 査読有

(6) Mizunami M., Matsumoto Y. (2010) Roles of aminergic neurons in formation and recall of associative memory in crickets. *Frontiers Behav. Neurosci.* 4, 172. DOI: 10.3389/fnbeh.2010.00172 査読有

(7) Mizunami M., Yamagata N. and Nishino H. (2010) Alarm pheromone processing in the ant brain: an evolutionary perspective. *Frontiers Behav. Neurosci.* 4, 28. DOI: 10.2289/fnbeh.2010.00028 査読有

(8) Yamagata N., Schmucker M., Szyszka P., Mizunami M., and Menzel R. (2009) Differential odor processing in two olfactory pathways in the honeybee. *Frontiers Systems Neurosci.* 3: 16. DOI: 10.3389/neuro.06.016.2009 査読有

(9) Matsumoto Y., Hatano A., Unoki S. and Mizunami M. (2009) Stimulation of the cAMP system by the nitric oxide-cGMP system underlying the formation of long-term memory in an insect. *Neurosci. Lett.* 467:81-85. DOI: 10.1016/j.neulet.2009.10.008 査読有

(10) Mizunami M., Unoki S., Mori Y.,

Hirashima D., Hatano A., and Matsumoto Y. (2009) Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in appetitive and aversive memory recall in an insect. *BMC Biology* 7:46. DOI: 10.1186/1741-7007-7-46 査読有

(11) Nakatani Y., Matsumoto Y., Mori Y., Hirashima D., Nishino H., Arikawa K. and Mizunami M. (2009) Why the carrot is more effective than the stick: Different dynamics of punishment memory and reward memory and its possible biological basis. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92:370-380. DOI: 10.1016/j.nlm.2009.05.003 査読有

(12) Nishino H., Yoritsune A., and Mizunami M. (2009) Different growth patterns of two adjacent glomeruli responsible for sex-pheromone processing during postembryonic development of the cockroach *Periplaneta americana*. *Neurosci. Lett.* 462: 219-224. DOI: 10.1016/j.neulet.2009.01.012 査読有

(13) Nishino H., Nishikawa M., Mizunami M., and Yokohari F. (2009) Functional and topographic segregation of glomeruli revealed by local staining of antennal sensory neurons in the honeybee *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* 515: 161-180. DOI: 10.1002/cne.22064 査読有

(14) Takahashi T., Hamada A., Miyawaki K., Matsumoto Y., Mito T., Noji S., and Mizunami M. (2009) Systemic RNA interference for the study of learning and memory in an insect. *J. Neurosci. Methods* 179: 9-15. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2009.01.002 査読有

[学会発表] (計 19 件)

(1) Mizunami M., Hatano A, Arai R, Matsumoto Y. Habit formation by extended Pavlovian training in crickets. 8th ICCPB, June 1, 2011, Nagoya convention center, Nagoya

(2) Matsumoto Y, Hirashima D, Mizunami M. Sensory preconditioning in the cricket *Gryllus bimaculatus*: Associations between neutral sensory stimuli. 8th ICCPB, June 1, 2011, Nagoya convention center, Nagoya.

(3) Nishino H, Iwasaki M, Mizunami M. Detection of female sex pheromone by male and female cockroaches: a comparative study. 8th ICCPB, June 1, 2011, Nagoya convention center, Nagoya.

(4) 水波誠、昆虫微小脳の機能的設計に関する研究 (動物学会賞受賞者講演) 日本動物学会、2011年9月22日、大雪クリスタルホール、旭川

(5) 松本幸久、佐藤千尋、水波誠、フタホシコオロギの嗅覚長期記憶のエピジェネティック制御、日本動物学会、2011年9月21日、大雪クリスタルホール、旭川

(6) 岩崎正純、水波誠、西野浩史、ワモンゴキブリのキノコ体における視覚と嗅覚情報の入力部位の比較、日本動物学会、2011年9月22日、大雪クリスタルホール、旭川

(7) 杉町誓児、吉富絵美、松本幸久、水波誠、岡田二郎、コオロギの嗅覚連合学習に対するカフェインの影響、環境ホルモン学会、2011年12月1日、東京大学、東京

(8) Mizunami M. Habit formation in insect classical conditioning. International Symposium of Life Science, March 22, 2009, Fukuoka University, Fukuoka

(9) 松本幸久、佐藤千尋、水波誠、コオロギの匂い学習・記憶におけるアセチルコリン受容体の働き、日本比較生理生化学会、2010年7月17日、九州産業大学、福岡

(10) Matsumoto Y, Matsumoto S.C., Takahashi T, and Mizunami M. Age-related memory impairment and its pharmacological rescue in the cricket. 9th International congress of Neuroethology, August 5, 2010, Salamanca University, Salamanca, Spain

(11) Matsumoto S.C, Matsumoto Y, and Mizunami M. Effect of epinastine on acquisition and retrieval of appetitive olfactory memory in the cockroach. 9th International congress of Neuroethology, August 5, 2010, Salamanca University, Salamanca, Spain

(12) Mizunami M. Unoki S, Matsumoto Y, Cognitive aspects of insect classical conditioning revealed by studying the roles of aminergic neurons in olfactory and visual memory recall. 9th International congress of Neuroethology, August 5, 2010, Salamanca University, Salamanca, Spain

(13) 松本幸久、佐藤千尋、水波誠、フタホシコオロギの加齢性記憶障害における一酸化窒素の役割、日本神経科学会、2010年9月3日、神戸国際会議場、神戸

(14) Mizunami M. Cognitive process underlying insect classical conditioning. Insect Genome Meeting, March 11, 2009, Riken, Kobe (invited)

(15) 水波誠、微小脳研究から脳進化の解明へ、成茂シンポジウム、日本動物学会、2009年9月27日、静岡グランシップ、静岡

(16) 水波誠、仲谷嘉洋、松本幸久、なぜ罰記憶は報酬記憶より忘れやすいのか？日本動物学会、2009年9月27日、静岡グランシップ、静岡

(17) 松本幸久、山方恒宏、佐藤千尋、河野芳明、水波誠、ゴキブリ触角葉における匂い刺激応答の光学計測、日本動物学会、2009年9月27日、静岡グランシップ、静岡

(18) Mizunami M. Insect “microbrains” : What can we learn from them? Satellite Symposium on Biomimetic Surface Engineering: Biomimetic Materials Design based on Biodiversity Inventory (Organizer: T Shimomura), October 3, 2009, Hokkaido Kaitaku-Kinenkan, Sapporo

(19) 松本幸久、水波誠、フタホシコオロギにおける連合条件付けの訓練間隔と記憶の関係、日本比較生理生化学会大会、2009年10月23日、千里ライフサイエンスセンター、大阪

[図書] (計1件)

(1) 水波誠、松本幸久 (2009) コオロギの学習と記憶 (分担執筆)、曾我部正博編、「動物は何を考えているのか? : 学習と記憶の比較生物学」、共立出版、pp.65-81.

[その他]
報道関連情報

(1) 北海道新聞に記事、「雌同士恋のライバル認知? ゴキブリの神経反応解析」2010年11月23日

(2) 北海道新聞に記事、「コオロギの脳内の仕組みを解明した北大大学院教授水波誠さん」、ひと2009年、2009年8月14日

(3) 科学新聞、コオロギの記憶読み出しにニューロンの活性化必要、2009年8月14日

(4) 北海道新聞に記事、「コオロギも考えています」、2009年8月5日

(5) 読売新聞に記事、「コオロギの記憶、高度な仕組み」、2009年8月5日

(6) HBC テレビで報道、「コオロギの記憶を解明」、The NEWS 北海道、2009年8月5日

アウトリーチ活動

(1) 北海道生物教育会第1回研究協議会にて研修会『比較神経解剖学～コオロギとヒヨコから研究課題を発見する』講師、2011年6月18日

学術上の受賞

「昆虫微小脳の機能的設計に関する研究」にて、日本動物学会賞を受賞。2011年9月22日

ホームページ情報

<https://www.sci.hokudai.ac.jp/~mizunami/MICROB~2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水波 誠 (MIZUNAMI MAKOTO)

北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：30174030

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし